

(19) 日本国特許庁 (JP)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平10-513257

(43) 公表日 平成10年(1998)12月15日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>  
 G 0 1 N 33/564  
 A 6 1 K 39/00  
 39/395  
 C 0 7 K 14/47  
 C 1 2 N 1/21

識別記号

F I  
 G 0 1 N 33/564  
 A 6 1 K 39/00  
 39/395  
 C 0 7 K 14/47  
 C 1 2 N 1/21

B  
A  
D

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平8-520501  
 (86) (22) 出願日 平成7年(1995)12月15日  
 (85) 翻訳文提出日 平成9年(1997)6月27日  
 (86) 国際出願番号 PCT/US95/16558  
 (87) 国際公開番号 WO96/20213  
 (87) 国際公開日 平成8年(1996)7月4日  
 (31) 優先権主張番号 08/364,081  
 (32) 優先日 1994年12月27日  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 リサーチ コーポレイション テクノロジーズ インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国 85711-3335 アリゾナ  
 州 ツーソン エヌ. ウィルモット ロード 101 スウィート 600  
 (72) 発明者 ブラカシュ、ラメシュ ケイ。  
 アメリカ合衆国 84124 ユタ州 ソルト  
 レイクシティ ニラ ウエイ 2846  
 (74) 代理人 弁理士 三好 秀和 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リューマチ性関節炎の診断用組換え抗原

## (57) 【要約】

組換え抗原(RAMA)を提供し、患者血清中のRAMA抗原に対するリューマチ性関節炎関連IgM抗体を検出することによりリューマチ性関節炎を診断する方法を開示する。RAMA抗原は配列番号3およびそれに実質的に相同的なペプチドからなる。RAMA抗原をコードする精製され单離されたDNAおよび前記DNAを含むトランスフォームされた宿主も開示される。

## 【特許請求の範囲】

1. 配列番号3およびそれに実質的に相同的な配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドからなる抗原であって、リューマチ性関節炎関連抗体に対して反応性を有するリューマチ性関節炎の診断用抗原。
2. 前記ペプチドが宿主細胞での組換え遺伝子の発現により作られる請求項1に記載の抗原。
3. 前記宿主細胞が原核細胞である請求項2に記載の抗原。
4. 前記宿主細胞が大腸菌 (*E. coli*) である請求項3に記載の抗原。
5. 前記ペプチドが配列番号3として同定されたアミノ酸配列を有する請求項4に記載の抗原。
6. 前記宿主細胞が真核細胞である請求項2に記載の抗原。
7. 前記ポリペプチドが化学合成により作られる請求項1に記載の抗原。
8. 前記リューマチ性関節炎関連抗体がIgM抗体である請求項1に記載の抗原。
9. 配列番号3およびそれに実質的に相同的な配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドからなり、リューマチ性関節炎関連抗体に対して反応性を有するリューマチ性関節炎の診断用組換え抗原の作製方法であって、

- (a) ヒト細胞から精製されたポリアデニル化RNAからのcDNAライブラリーを作製する工程と、ここで前記ライブラリーは、組換えベクターが作られるように、ポリアデニル化RNAから得られるcDNAをクローニングベクターでのランダムクローニングにより調製されるものであり；
- (b) リューマチ性関節炎を有する患者からの血清中の抗体により検出された組換え抗原を発現する組換えベクターを選択する工程と；
- (c) 工程(b)で選択された組換えベクターで宿主をトランスフォームし、このトランスフォームされた宿主を適当な栄養培地で培養して前記組換え抗原を発現する工程と；およびその後に、
- (d) 組換え抗原を単離する工程と  
を備える方法。

10. 工程 (c) がさらに最適細胞密度まで宿主を増殖させ、次いで組換え抗原の発現を誘導することを備える請求項 9 に記載の方法。

11. 工程 (d) がさらに組換え抗原をアフィニティークロマトグラフィーにより精製することをそなえる請求項 9 に記載の方法。

12. 天然 RAMA タンパク質の一次構造コンフォメーションの少なくとも一部と抗原活性とを有するペプチドを宿主細胞で発現することを確実とするために使用される DNA であって、前記 DNA は、

(a) 配列番号 2；

(b) 配列番号 2 とハイブリダイズする DNA またはその断片；および

(c) 遺伝子コードの縮退以外は (a) および (b) に定義される DNA とハイブリダイズする DNA

からなる群から選択される精製され単離された DNA。

13. さらに宿主をトランスフォームするのに適合させたベクターを含む請求項 12 に記載の精製され単離された DNA。

14. ベクターがプラスミド、コスミド、ファージミド、ファージおよびウイルスからなる群から選択される請求項 13 に記載の精製され単離された DNA。

15. ベクターがプラスミドである請求項 14 に記載の精製され単離された DNA。

16. 宿主細胞が大腸菌 (*E. coli*) である請求項 15 に記載の精製され単離された DNA。

17. 前記 DNA が配列番号 2 である請求項 16 に記載の精製され単離された DNA。

18. 宿主が真核細胞である請求項 14 に記載の精製され単離された DNA。

19. 天然 RAMA タンパク質の一次構造コンフォメーションの少なくとも一部と抗原活性とを有するペプチドをトランスフォームされた宿主で発現することを確実するために使用され、

(a) 配列番号 2；

- (b) 配列番号2とハイブリダイズするDNAまたはその断片；および  
(c) 遺伝子コードの縮退以外は(a)および(b)に定義されるDNAとハイブリダイズするDNA

からなる群から選択されるDNAセグメントを含むトランスフォームされた宿主。

20. 前記DNAセグメントが組換えベクターに含まれている請求項19に記載のトランスフォームされた宿主。

21. 組換えベクターがプラスミド、コスミド、ファージミド、ファージおよびウイルスからなる群から選択される請求項20に記載のトランスフォームされた宿主。

22. 組換えベクターがプラスミドである請求項21に記載のトランスフォームされた宿主。

23. 宿主細胞が大腸菌(E. coli)である請求項22に記載のトランスフォームされた宿主。

24. 前記DNAが配列番号2である請求項23に記載の精製され単離されたDNA。

25. 宿主が真核細胞である請求項20に記載の精製され単離されたDNA。

26. 配列番号3およびそれに実質的に相同意向な配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドからなり、リューマチ性関節炎関連抗体に対して反応性を有するリューマチ性関節炎の診断用抗原をコードする組換えDNAの作製方法であつて、

- (a) ヒト細胞からポリアデニル化RNAを単離する工程と；  
(b) 鑄型として単離されたポリアデニル化RNAを用いて2本鎖cDNAを作る工程と；  
(c) この2本鎖cDNAをクローニングベクターに挿入して組換え発現ベクターを作製する工程と、ここで前記組換えベクターは抗原の発見のために正しい相で前記抗原をコードするDNAを有するものであり；  
(d) この組換え発現ベクターで宿主をトランスフォームして前記抗原を発現

させる工程と；および

(e) リューマチ性関節炎患者の血清からの抗体を用いて、前記抗体が前記発現抗原に結合することを検出することによりトランスフォームされた宿主を選択する工程と

を備える方法。

27. 工程 (e) において、結合した抗体を有するトランスフォームされた宿主が抗ヒト IgM 抗体-アルカリホフファターゼ複合体と、その後に添加する 1 種類以上のアルカリホスファターゼ顯色基質とによって検出される請求項 26 に記載の方法。

28. 顯色基質がニトロブルーテトラゾリウムおよび 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェートである請求項 27 に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## リューマチ性関節炎の診断用組換え抗原

発明の背景

本発明はリューマチ性関節炎の診断方法に関する。より具体的には、本発明は組換え抗原と反応する患者血清中のリューマチ性関節炎関連抗体の存在または不存在の定量によるリューマチ性関節炎の客観的な診断方法に関する。さらに、本発明は組換え抗原およびその遺伝子の分子クローンに関する。

リューマチ性関節炎は人口のかなりのパーセントで影響を与える慢性的な全身性リューマチ疾患である。慣習的に、患者による臨床的な観察または主訴により主観的に診断されてきた (P. Lipsky, *Rheumatoid Arthritis, Harrison's Principles of Internal Medicine* 1423(1987))。よって、リューマチ性関節炎の臨床的な診断は診断医の技能および患者の疾患の症状の重篤度に委ねられている。

リューマチ性関節炎の客観的な診断に関して、リューマチ性関節炎患者の血清中のリューマチ因子 (R f) の存在がルーチン的に測定されている。R f は Ig G 免疫グロブリン不变部領域に結合する自己抗体である。血液中の R f の存在を測定する標準的な試験は、R f が Ig G の凝集を引き起こす凝集試験である。R f は、リュー

マチ性関節炎の臨床的症状を示す約 70% の患者で検出してきた。よって、これらの患者は「血清陽性」と称される。残りの 30% は「血清陰性」リューマチ性関節炎を有すると分類される。リューマチ性関節炎以外に多くの疾患がリューマチ因子の存在に関連する。したがって、R f の存在に基づいてリューマチ性関節炎の決定的な診断が確立されることはない。実施するのに迅速で容易であり、放射性同位元素をともなわず、または患者を冒すことがなく侵襲的でない、血清中の R f の存在よりも、臨床的な診断により密接に関連するリューマチ性関節炎の客観的な診断方法が必要とされている。

多様な自己免疫リューマチ疾患を有する患者からの血清は、細胞の主に核成分に対する循環性の自己抗体を含有する (E. Tan, *33 Advances in Immunology* 16 7-240(1982))。これらの抗体は抗核抗体 (ANA) と称され、それらの各自己

免疫疾患に特異的であり、臨床医学における診断用補助物として有用である。これらの抗体に対する抗原の一部はバイオテクノロジーの方法により作られ、各自自己免疫疾患の診断に用いられている (R. Michael および J. Keene, Molecular Biology of Nuclear Autoantigen, 18 Rheumatoid Disease Clinics of North America 283-310 (D. Pisetsky, 編, 1992) )。これらの自己免疫疾患に対する診断試験の開発の成功は、同様なアプローチがリューマチ性関節炎に対して有益であることを示唆する。

リューマチ性関節炎患者からの血清も細胞の成分に対する抗体を含有することが発見された。寒天ゲル拡散試験で、リューマチ性関節炎患者からの血清と、ある種のエプスタイン・バーウイルスでトランスフォームされたヒトBリンパ球細胞系、例えばWIL-2やRaji細胞系からの抽出物とを隣接するウェルに置くと、沈降素のラインが形成される (M. Alspaugh および E. Tan, 19 Arthritis and Rheumatism 711-19(1976))。この沈殿の原因となる抗体はIgGタイプであり、それが反応する抗原は核抗原である。よって、この抗原は「リューマチ性関節炎核抗原 (rheumatoid arthritis nuclear antigen)」または「RANA」と称されている。

RANAの存在に基づく診断試験を開発可能とする前にいくつかの問題を克服する必要がある。この抗原の同一性 (identity) は知られていない。かりにそれが知られていたとしても、細胞中に小量しか存在していないので、均質な程度にまで精製することは困難である。このような純度が必要とされるが、その理由としては小量の抗原を検出するように工夫された血清学的試験の極端な感度の場合、夾雑物がRANAとともに精製されると偽陽性を生じることがあるためである。

これらの理由から、本発明はリューマチ性関節炎の定量的検出に対する異なるアプローチを開示する。このアプローチは組換えDNA技術による組換え抗原の生産、およびこの新規な抗原に対するリューマチ性関節炎関連

抗体の患者血清中における検出をともなうものである。この組換え抗原は市販の

抗R A N A 抗体とは反応しない。

#### 発明の目的と要約

本発明の一つの目的は、リューマチ性関節炎の診断方法を提供することにある。

本発明の別の目的は、患者血清の血清学的分析、例えばE L I S A 分析によるリューマチ性関節炎の診断方法を提供することにある。

さらに、本発明の目的は、リューマチ性関節炎関連抗体により検出可能な組換え抗原の発現を指令することができる核酸を提供することにある。

さらに、本発明の別の目的は、リューマチ性関節炎関連抗体により検出可能な組換え抗原を提供することにある。

これらの目的と他の目的は、配列番号3およびそれと実質的に相同意向な配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドからなる、リューマチ性関節炎の診断用抗原を提供することにより達成され、前記の抗原はリューマチ性関節炎関連抗体に対して反応性を有するものである。この抗原は原核または真核の宿主細胞で発現させることができ、または化学的に合成することができる。これらのリューマチ性関節炎関連抗体はI g Mサブタイプである。

また、本発明は、天然のR A M A タンパク質の一次構

造コンフォメーションの少なくとも一部と抗原活性とを有するペプチドの宿主細胞での発現を確実とするのに使用される精製され単離されたD N A を包含し、該D N A は、

- (a) 配列番号2、
- (b) 配列番号2とハイブリダイズするD N A またはその断片、および
- (c) 遺伝子コードの縮退以外は(a)および(b)で定義されたD N A とハイブリダイズするD N A からなる群から選択される。さらに、この精製され単離されたD N A は宿主のトランスフォームに適したベクターを含むことができ、該ベクターはプラスミド、コスミド、ファージミド、ファージ、ウイルス等からなる群から選択される。宿主は大腸菌(E. coli)等の原核細胞でも真核細胞でもよい。

図面の簡単な説明

図1は、健康人（H）からの血清、リューマチ性関節炎（RA）の血清および全身性エリテマトーデス（SLE）の血清の本発明によるELISA試験結果を示すグラフである。

詳細な説明

本発明の組換え抗原および分子的にクローニングされたその遺伝子を開示し、記載する前に、ここに開示され

た特定の方法の工程と材料とは若干変更してもよいので、本発明はそのような方法の工程と材料とに限定されるものではないことを理解されたい。また、本発明の範囲は添付の請求の範囲とその均等物によってのみ限定されるものであって、ここで使用される用語は特定の実施態様を説明する目的のためにだけに用いられるもので、限定することを意味するものではない。

本明細書および添付の請求の範囲で用いられる単数形（"a"、"an"および"the"の単数形）はその文脈が明らかに示さない場合は複数形のものを包含する。よって、例えば「ペプチド」（"a peptide"）を含有する抗原と称した場合は2種類以上のペプチドの混合物を包含し、「宿主細胞」（"a host cell"）と称した場合は1種類以上のそのような宿主細胞を包含し、「プラスミド」（"a plasmid"）と称する場合は2種類以上のプラスミドの混合物を包含するものである。

本発明を説明し、特許請求する際に、以下の用語を以下に示す定義にしたがつて用いることとする。

ここに用いられる「RAMA」は、ATCC 69605として寄託されているプラスミドによりコードされる本発明のリューマチ性関節炎IgM関連抗原を意味する。

ここに用いられる「ペプチド」は、どのような長さのペプチドをも意味し、またタンパク質を包含する。「ポリペプチド」および「オリゴペプチド」という用語は特

定の大きさが示されない限り、特定の大きさを意図するという限定をすることな

しにここで用いられる。

ここに用いられる「DNA」は、DNA、および遺伝情報を保存することができる他の核酸を意味する。例えば、RAMA遺伝子のインビトロ転写により得られるRNAはDNAという用語の範囲に含まれる。

ここに用いられる「ベクター」は、宿主細胞中で複製することができ、かつベクターに挿入される外来核酸を保有することのできる遺伝子要素を意味する。本発明の範囲内で用いることができるベクターとしては、プラスミド、コスミド、ファージミド、ファージ、ウイルス等が例示される。

ここに用いられる「実質的に相同的な」は、比較されるポリヌクレオチドおよびポリペプチドとは一次構造が異なるにもかかわらず機能性を保持するポリヌクレオチドおよびポリペプチドを意味する。例えば、配列番号2に実質的に相同的なポリヌクレオチドは、配列番号3のアミノ酸配列を有する天然タンパク質の一次構造コンフォメーションの少なくとも一部と抗原活性とを有するポリペプチド産物の宿主細胞における発現を確保することができるものであり、該ポリヌクレオチドは、(a)配列番号2とハイブリダイズするポリヌクレオチドまたはその断片、および(b)遺伝子コードの縮退以外は配列番号2および(a)とに定義したポリヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドから選択される。  
さ

らに具体例として、配列番号3に実質的に相同的なポリペプチドはリューマチ性関節炎関連抗体と反応性のある抗原としての機能を保持するものであるが、該ポリペプチドはさらに余分なアミノ酸残基を有していてもよく、または配列番号3のトランケートされた変異体、欠損変異体、または置換変異体であってもよい。置換変異体は、1個以上のアミノ酸残基の保存的な置換を含有するものである。保存的な置換とは、ペプチドの機能（この場合はリューマチ性関節炎関連抗体と反応性のある抗原としての機能）を保持しながらあるアミノ酸残基が別のものに置換されたものである。ある種の保存的な置換基に属するアミノ酸残基はしばしば同じグループ内の別のアミノ酸残基と置換することができる。そのような一つのグループは、Pro; Ala, Gly; Ser, Thr; Asn, Gln; Asp; Glu; His; Lys, Arg

; Cys; Ile, Leu, Met, Val; および Phe, Trp, Tyr である (M. Jimenez-Montan  
o および L. Zamora-Cortina、アミノ酸配列の生成の進化モデルおよびその哺  
乳類  $\alpha$ -ヘモグロビン鎖の研究への応用、Proc. VII th Int'l Biophysics Cong  
ress, Mexico City(1981))。実質的に相同的であると思われる他の変異として  
は、天然レアミノ酸に対するDアミノ酸置換、例えば付加側鎖を有するようなア  
ミノ酸誘導体の置換、および非標準的なアミノ酸（すなわち、タンパク質中では  
稀であるかまたは存在しない  $\alpha$ -アミノ酸）の置換が挙げられる。実質的に相同  
的なポリペプチドの一次構造は機能

によってのみ限定される。

新規な抗原（「RAMA」）をコードする遺伝子は、ここで文献の援用として  
挙げる 1993 年 2 月 19 日に出願された同時係属中の米国特許出願第 08/0  
19, 780 号に記載のように、分子的にクローニングされ、細菌および真核タ  
ンパク質発現システムで発現される。RAMA 抗原のクローニングと発現にとも  
なうステップを簡単に記載すれば以下の通りである。ポリアデニル化 mRNA を  
約  $1 \times 10^8$  個のヒト Raji 細胞 (ATCC No. CCL 86) から「フ  
ァーストラック (FAST TRACK)」mRNA 单離用キット (Invitrogen、サンデ  
イエゴ、カリフォルニア州、米国) を用いて单離した。細胞を溶解し、ホモゲナ  
イズし、プロテアーゼとともにインキュベートし、次にオリゴ (dT) セルロー  
スクロマトグラフィーにかけた。得られたポリアデニル化 RNA を次に鑄型材料  
として用い、市販のキット ( $\lambda$  ライブラリアン ( $\lambda$  Librarian)、Invitrogen  
) を用いて 2 本鎖 cDNA を調製した。このキットで用いられる方法は Okayama  
と Berg (2 Molecular and Cellular Biology 161(1982)) および Gubler と Hoffma  
n (25 Gene 263(1983)) によって記載された方法である。cDNA の両末端を T  
4 ポリメラーゼで処理し平滑化した。Eco RI リンカーをこの平滑化 cDNA  
に T4 DNA リガーゼを用いて連結した。このリンカーは次の配列を有する。

5' - AATTCTGGCGGCCGC-3' (配列番号 1 )

3' - GCGCCGGCGG-5'

このリンカーを構成する短い方のオリゴマーの5'末端はリン酸化を行ったが、長い方のオリゴマー（配列番号1）の5'末端はリン酸化しなかった。いったんリンカーを付加してから、cDNAをT4ポリヌクレオチドキナーゼで処理して、EcoRIリンカーの突出5'末端をリン酸化した。これらの方法から得られる2本鎖cDNAは、多様な長さの分布を示すcDNAならびに過剰の未反応のリンカーを有していた。この未反応リンカーを除去して、アガロースゲル電気泳動によりcDNAを分画することにより1~5kbpの範囲のcDNAを選択した。分画完了後、ゲルをゲル装置から取り出し、cDNAを臭化エチジウムにより可視化し、cDNAレーンのスライスを1~5kbpの所望の大きさに対応するように切断した。このcDNAをすぐに電気溶出した。

次に、サイズで選択されたこの2本鎖cDNAをファージ $\lambda$ gt11クローンベクター中でクローニングした (R. Young および R. Davis, 80 Proc. Nat'l Acad. Sci USA 1194-98(1983); T. Hyynh ら, 1 DNA Cloning: A Practical Approach 49-78 (D. Glover, ed, IRL Press, Oxford, 1985) )。このベクターのEcoRIクローニングサイトは、 $\lambda$ gt11ベクターを作る際にファージ $\lambda$ DNAに挿入されている大腸菌 (E. coli)

$\lambda$ acZ遺伝子内に位置している。この $\lambda$ acZ遺伝子は酵素 $\beta$ -ガラクトシダーゼをコードする。EcoRIサイトでのクローニングによりこの遺伝子に挿入されたDNA断片は、 $\lambda$ acプロモーターの制御下で不活性な組換え $\beta$ -ガラクトシダーゼ酵素を作る融合遺伝子をもたらす。組換えファージは、ラクトース類似体の5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-ガラクトシド (X-gal) を含有するインディケータープレート上で青色のプラークを形成できないので、これらのファージを認識し、選択することができる。 $\lambda$ gt11ファージは $\lambda$ ac<sup>+</sup>であるために、無色のX-galを代謝物質に切断することができ、該代謝物質は自己構築して青色インドール化合物となる。EcoRIで消化され、脱リン酸化された $\lambda$ gt11DNAをInvitrogenから得た。

連結されたDNAを次に Promega社 (ウィスコンシン州、マジソン) から市販され入手した「パッケージン (PACKAGENE)」ファージ $\lambda$ パッケージングシステ

ムでパッケージし、組換えファージの力値を供給会社の指示書にしたがって測定した。

組換え抗原は Promega社からの「プロトプロット (PROTOBLOT)」免疫スクリーニングシステムに関する技術マニュアルに記載された非放射活性免疫プロット技術を用いて単離した。Y1090宿主細胞を、 $\lambda$ gt11ライブラリーからの $3 \times 10^4$ 個のplaques形成単位 (P

FU) の組換えファージに感染させ、次にこれを寒天プレートに塗布した。プレートに、10mMのIPTGで前もって飽和しておいた乾いたニトロセルロースフィルターを重ねて37°Cでインキュベートした。インキュベーション中、溶菌的に感染した細胞から放出されるファージとタンパク質はフィルターに付着した。フィルターをプレートから除去し、ブロックして他のタンパク質がプレートへ付着するのを防止した。次に、リューマチ性関節炎を有すると臨床的に決定された患者の血清 (TBS T緩衝液: 10mMトリス塩酸、pH 8.0、1mM EDTA、0.05%「トゥイーン (TWEEN) - 20」、により1:20に希釈) をフィルターとともにインキュベートした。次に、フィルターをTBS Tで洗浄し、非特異的に結合した抗体を除去した。次に、フィルターを抗IgM抗体ーアルカリホスファターゼ複合体 (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.、ガイセルブルク、メリーランド州; TBS Tにより1:100に希釈) とともにインキュベートした。次に、フィルターを再び洗浄し、顯色基質であるニトロブルーテトラゾリウム (NBT) および5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェート (BCIP) を加えた。陽性plaquesはアルカリホスファターゼの活性の結果として暗い紫色を生じた。陽性plaquesを再試験し、試験プレート上のすべてのplaquesが陽性シグナルを生じるまでリプレートを行うことにより精製した。

精製された賜性の組換え $\lambda$ gt11ファージの溶原菌 (lysogen) を Promega社の技術解説書No. 006にしたがって作った。T. Maniatisらにより記載のアルカリ溶解ミニプレップ・プロトコール (Molecular Cloning: A Laboratory

Manual (Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, New York, 1982) を用いて、組換えファージDNAを $\lambda$ gt11溶原菌から単離した。このDNAをEcoRIで消化し、得られたDNA断片を0.7%低融点アガロースゲルによる電気泳動で分画した。臭化エチジウム染色および紫外線照射により、特異な2600bpのバンドが明らかとなった。このバンドをゲルからスライス状に切り出し、そのアガロースを70℃でメルトした。次に、DNAをフェノール抽出し、そしてアルコールで沈殿させた。

次に、標準的な方法(例えばJ. Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual(第2版, 1989); T. Maniatisら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual(1982); F. Ausubelら, Current Protocols in Molecular Biology(1987))を用いて、Invitrogenから得られたプラスミド発現ベクター「pTrcHis C」のEcoRIサイトで前記の2600bpのEcoRI断片を再クローニングした。このベクターは $\lambda$ gt11と同じリーディングフレームを有し、かつ大腸菌(E. coli)で高いレベルのタンパク質発現を得るためにすべてのDNA配列を有し、さらに6個の連続したヒスチジン残基をコード

する配列を有しており、発現されたタンパク質は該ヒスチジン残基によりNi荷電の「プロバンド(PROBOND)」樹脂(Invitrogen)に結合するので、この組換えたタンパク質は1ステップ精製で容易に精製することができる。前記の2600bp断片を有するpTrcHis Cプラスミドで大腸菌(E. coli)株Top10(Invitrogenより入手)をトランスフォームした。

組換えたタンパク質の発現はウエスタンブロッティング分析により示された。トランスフォーム体はLuria-Bertani(LB)で37℃にてOD<sub>600</sub>が0.5になるまで増殖させた。次に、lacオペロンの誘導物質であるイソプロピルチオ-β-D-ガラクトシド(IPTG)を1mMの最終濃度まで加えて組換えたタンパク質の発現を誘導した。誘導後、トランスフォーム体をさらに3時間30℃で成長させた。次に、約200μlの培養物を遠心チューブに入れ、軽く遠心して細胞をペレット状にした。培養液(プロス)は除去して捨て、ペレットをSDS含有緩衝液に再懸濁した(上記のT. Maniatisら)。この試料を2時間沸騰湯浴

中で加熱し、10% SDSポリアクリルアミドゲルにかけ、70ボルトで一晩電気泳動した（上記のT. Maniatisら）。「ポリプロット（POLYBLOT）」エレクトロトランスマーカーシステム（American Biometrics社、ハイワード、カリフォルニア州）を用い、同社の指示マニュアルにしたがって、タンパク質を電気泳動によりニトロセルロースメンブレンに移した。

移した後、メンブレンを取り出し、次にブロックしてタンパク質の非特異的な結合を防いだ。リューマチ性関節炎の患者の血清（1：21に希釈）をメンブレンに加えて1時間インキュベートした。次にこのメンブレンをTBS Tで洗浄した。次に、プラーケスクリーニング法と同じように、このメンブレンを抗IgM抗体—アルカリホスファターゼ複合体（Kirkegaard & Perry）とともにインキュベートした。次に、このメンブレンをTBS Tで洗浄し、NBTとBCIPを加えることで顕色させた。

これらの試験で、リファレンス血清と反応する約48kDのタンパク質に対応する単一バンドが明らかとなった。約4kDのタンパク質配列はプラスミドベクターに由来するもので、発現ベクターにより作られた残りの44kDのタンパク質がリューマチ性関節炎患者の血清と反応する抗原に由来するものであることを示唆している。

#### 組換え抗原遺伝子の配列決定

クローニングしたcDNAをF.Sangerらの方法（DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors, 74Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 5463(1977)）による塩基配列の分析に供した。993bpセグメントのDNAからなるオープンリーディングフレームが明らかにされた。このオープンリーディングフレーム（配列番号2）は、本発明の組換えRAMA抗原を構成する331アミノ酸のタンパク質（配列番号3）をコードする。

#### 組換え抗原の細菌からの精製

細菌プラスミド発現ベクターにより発現される組換えRAMAタンパク質は、Invitrogenの「プロボンド（PROBOND）」カラムを用い、該カラムとともに提供

される同社の指示書にしたがって精製した。発現プラスミドを含有するBL21細胞 (F'ompT hsdS<sub>b</sub> [r<sub>b</sub> m<sub>b</sub> dcm]) (プロテアーゼ株、Novagen、マジソン、ウィスコンシン州) の一晩培養した培養物10mlを、グルコースと50μg/mlのアンピシリンとを含有する約1リットルのLBに接種した。この細胞を2.5時間成長させ、この間にIPTGを1mMの最終濃度まで加えて、組換えRAMAタンパク質の発現を誘導した。誘導後、細胞をさらに3時間37℃でインキュベートした。次に、細胞を遠心により集め、再懸濁し、リゾチームおよび超音波により溶解した。次に細胞を10,000rpmで遠心した。組換えRAMAタンパク質は可溶性であり、上清中にとどまった。

組換えRAMAタンパク質の発現をウエスタンプロッティング分析により確認した。組換えRAMAタンパク質試料をポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、ニトロセルロースメンブレンへ電気泳動により移した後、タンパク質の非特異的な結合をロックした。リューマチ性関節炎患者の血清をメンブレンに結合しているタンパク質に1:21の希釀度で加え、1時間インキュベートした。次に、このメンブレンを洗浄し、抗ヒトIgM-アルカリホスファターゼ複合体とともにインキュベート

した。顯色基質溶液を加える前にメンブレンを再び洗浄した。約41,000のMrを有する単一のタンパク質バンドがリューマチ性関節炎患者の血清と反応した。これは、その配列に基づくRAMAタンパク質(約34kd)の予想されたサイズとかなり良好な一致を示している。

#### 真核細胞における組換えRAMAの発現

RAMA遺伝子を含有する2600bpのDNA断片を、標準的な方法によりpBlueBacHis C バキュロウイルスベクター (Invitrogen) で再びクローニングした。RAMA遺伝子を有するこのpBlueBacHis Cベクターを「バキュロゴールド (BACULOGOLD)」(Pharmingen、サンディエゴ、カリフォルニア州) バキュロウイルスDNAとともにSpodoptera frugiperda Sf9細胞にコートランスフェクトした。これらのDNA間の相同組換えの結果、ウイルスのポリヘドリンエンハンサー／プロモーターエレメントの制御下で発現されるRAMA遺伝子を有す

る組換えウイルスが得られた。この組換えウイルスを S f 9 昆虫細胞で作らせ、Invitrogen のマニュアルに記載されているようにして精製した。次に、Invitrogen のマニュアルにしたがって組換えウイルスのプラーカ精製のために、このウイルス保存物を用いて 10 倍希釈物を調製した。

pBlueBacHis C での RAMA 遺伝子の発現はウエスタンブロッティング分析により確認した。約 1 ml の S f

9 昆虫細胞に組換えプラスミドを有するウイルスを感染させ、その 3 日後にこの細胞をペレット化し、100 μl の Laemmli 緩衝液に溶解した (U. Laemmli, 227 Nature 680-85 (1970) )。この試料を 2 時間沸騰し、次に上記のように 7.5 % SDS - ポリアクリルアミドゲルに負荷し、70 ボルトで一晩電気泳動した。上記のように、タンパク質を電気泳動によりニトロセルロースメンブレンに移し、タンパク質の非特異的な結合をブロックした。リューマチ性関節炎患者の血清を 1 : 21 の希釈度でメンブレン結合タンパク質に加え、1 時間インキュベートした。次に、このメンブレンを TBS で洗浄し、抗ヒト IgM - アルカリホスファターゼ複合体とともに 30 分間インキュベートした。顯色基質溶液を加える前にこのメンブレンを再び TBS で洗浄した。約 100,000 の Mr を有する単一のタンパク質バンドがリューマチ性関節炎患者からの血清と反応した。細菌で発現された RAMA タンパク質と真核細胞で発現された RAMA タンパク質の Mr の違いは、真核細胞中の発現タンパク質のグリコシル化および恐らくはそれ以外の修飾によるものと思われる。この真核細胞システムでの発現により作られた組換え RAMA タンパク質を上記のように Ni 荷電「プロボンド (PROBOND) 」カラムで精製した。約 1.5 mg のタンパク質を 50 ml の培養物から精製した。

#### 組換え RAMA タンパク質の E L I S A 試験

大腸菌 (E. coli) 系での発現により作られ、「プロボンド (PROBOND) 」カラムで精製された約 100 μl の組換え RAMA タンパク質溶液 (PBS 緩衝液 (pH 7.4) 中の 1 μg / ml の精製組換えタンパク質) をポリスチレン製マ

イクロタイタープレート（高結合 (High binding) 96 ウエルコーニング (Cornering) プレート）のウェルに入れ、4℃で一晩インキュベートした。このプレートを洗浄し、次に4℃で一晩ブロックして非特異的な結合を防いだ。1:21で希釈された100μlの血清をウェルに入れ、1時間インキュベートし、次にウェルを洗浄した。アルカリホスファターゼ複合化抗ヒト IgM (Kirkegaard & Perry) の100μlをウェルに入れ、1時間インキュベートし、次にウェルを再び洗浄した。次に、5mgのp-ニトロフェノールホスフェートと1mlの5%ジエタノールアミン緩衝液 (Kirkegaard & Perryより供給されたもの) とを4mlの蒸留水に加えて調製した100μlのアルカリホスファターゼ基質をウェルに加えて37℃で15分間インキュベートした。次に、その光学濃度を405nmにて測定した。

リューマチ性関節炎の臨床的症状を有する患者60名 (Rf+に関して35名は血清陽性であり、25名は血清陰性である)、SLEに関する抗DNA疾患マークーに対して血清陽性である20名、および健康人20名からの血清を既に概略した方法により調べた。これらの試験の結果を図1と下記の表に要約する。

血清	総数	RAMA <sup>+</sup>	RAMA <sup>-</sup>	ハ° - セント
Rf <sup>+</sup>	35	34	1	97
Rf <sup>-</sup>	25	11	14	44
抗 DNA <sup>+</sup>	20	3	17	15
健康人	20	0	20	0

すべての健康被験者の血清は0.250以下のELISA値を示した。よって、0.250の読みは陽性反応を決定するためのカットオフ値とみなされた。血清陽性のリューマチ性関節炎患者の35血清のうち34血清 (すなわち97%) が0.250以上のELISA値を示したために、これらは陽性反応を示しているとみなされた。血清陰性のリューマチ性関節炎患者からの25血清のうち、11 (すなわち44%) が0.250以上のELISA値を示したために、これらは陽性反応を示しているとみなされた。対照の抗DNA<sup>+</sup>20血清のうち3血清

も陽性反応を示した。したがって、これらの結果はほとんどすべての血清陽性のリューマチ性関節炎患者がこのELISA試験の助けによる診断で、RAMA組換え抗原に対する、血清中の抗体の存在を検出することができたことを示している。さらに、血清陰性のリューマチ性関節炎患者のほぼ半数も同様に診断することができた。これらの結果は、標準的なRf試験を用いた場合が約70%にすぎないのに比較して約85%のリューマ

チ性関節炎のケースが本発明を用いて診断することができるこことを示唆している。

RAMAがRfではないことを示すために、さらに別の試験を行った。組換えRAMAタンパク質を用いる標準的なRf凝集試験を行うために独立した対照実験室と契約した。IgGの凝集は形成されなかった。これは、Rfを陽性の対照として同じように検定した場合には凝集が形成したために陰性の結果である。さらに、組換えRAMA抗原をマイクロタイタープレートのウェルに付着させ、結合したRAMA抗原を次に酵素複合体化IgG抗体にさらした。酵素活性の比色定量アッセイを上記のように行った。酵素活性は検出されず、IgG抗体がRAMAタンパク質と結合しないことを示している。最後に、Rfとの反応に関してELISAにより試験された場合に陽性の結果を示した7名の臨床的に正常な被験者（すなわちすべての7名の被験者がRfに関して血清陽性である）を一次抗原としてRAMAを用いるELISAを用いて調べた。7名全員がRAMAとの反応で血清陰性であった。これらの結果は本発明の主題である組換えRAMAタンパク質がRfではないことを示している。

#### RAMA活性を有するペプチド

本発明の範囲はRAMAペプチドの活性を有するものであればいかなるペプチドも包含するものである。そのようなペプチドは配列番号3としての組換えRAMAお

よびそれと実質的に相同的なペプチドを包含し得る。天然のRAMAに実質的に相同的なペプチドの具体例は、6個のヒスチジン残基が付加されて、金属含有樹

脂を用いるアフィニティクロマトグラフィーによる精製が容易となった上記の組換えRAMAである。6個のヒスチジン残基の付加にもかかわらず、組換えRAMAはリューマチ性関節炎関連IgM抗体に対して反応性があった。RAMAに実質的に相同的なペプチドは既に詳しく説明したように宿主細胞による発現によるか、または化学合成によって合成することができる。

リューマチ性関節炎関連抗体を検出するための短いペプチドは以下のように同定し、調製することができる。エンドプロテイナーゼ-1ysC (Boehringer Mannheim) を同社の指示にしたがって用いることでRAMAタンパク質をペプチド断片に消化した。これらの断片をHPLCで分画して、その配列をN. Legendre およびP.T. Matsudairaの方法にしたがって決定した (Gel Electrophoresis, A Practical Guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing 52-66(P.T. Matsudaira編, 1989))。さらに別の断片をRAMAのプロテイナーゼ消化とポリアクリルアミドゲルによる分離により調製する (J. Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual(第2版, 1989))。これらの断片をウエスタンブロッティングに供して (H. Towbinら, Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacryl

amide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications, 76 Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 4350(1979))、リューマチ性関節炎関連抗体が結合した断片を同定した。抗体と反応するペプチドの配列決定を行う。リューマチ性関節炎関連抗体により認識されるエピトープを有するRAMAの单一または複数の断片の同定後、プロテイナーゼによる消化、ウエスタンブロッティングおよび配列決定のプロセスを、さらに小さいペプチドを作る異なるプロテイナーゼを用いて繰り返した。この方法により抗体により認識される配列の同定ができる。これらのデータから、類似の配列を有するオリゴペプチドを化学合成（ここで文献の援用として挙げる B. Merrifield, 85 J. Am. Chem. Soc. 2149-2156(1963); B. Merrifieldら, 21 Biochemistry 5020-31(1982); Houghten, 82 Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 5131-35(1985))によるか、またはバイオテクノロジーによる方法 (J. Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版,

1989) ) により合成され、リューマチ性関節炎関連抗体に対する反応性について調べた。酵素のいくつかのペプチド擬似 (peptidomimetic) 阻害剤がこれらの技術を用いて記載されている (A. Smithら, Design and Synthesis of Peptidomimetic Inhibitors of HIV-1 Protease and Renin: Evidence for Improved Transport, 37 J. Med. Chem. 215 (1994) ; S. Francisら, Molecular Characterization and Inhibition of a

*Plasmodium falciparum* Aspartic Hemoglobinase, 13 EMBO J. 306(1994); A. Garciaら, Peptidomimetic Inhibitors of Ras Farnesylation and Function in Whole Cells, 268 J. Biol. Chem. 18415(1993))。

#### 微生物材料の寄託

ここに記載され、リューマチ性関節炎を診断するために用いられる組換えR A MA抗原をコードする遺伝子を有するプラスミドを含有する大腸菌 (*E. coli*) 株寄託物は1994年4月13日に国際寄託機関であるアメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC) 、12301パークローンドライブ、ロックビル、メリーランド州 20852 米国に寄託されている。寄託された株の寄託番号はATCC 69605である。

配列表

(1) 一般的な情報：

- (i) 出願人： ラメシュ K. パラカシュ  
 (ii) 発明の名称： リューマチ性関節炎の診断用  
     組換え抗原

(iii) 配列の数： 3

(iv) 住所：

- (A) 宛先： トップ、ノース & ウエスタン  
 (B) 街： 9035 サース 700 イースト、  
     スイート 200  
 (C) 市： サンディ  
 (D) 州： ユタ  
 (E) 国： 米国  
 (F) 郵便番号： 84070

(v) コンピュータ読取可能形態：

- (A) 媒体の種類： ディスクケット、3.5インチ、  
     720kb

- (B) コンピュータ： IBMシンクパッド340  
 (C) オペレーティングシステム： DOS 6.2  
 (D) ソフトウェア： ワードパーフェクト 6.0

(vi) 現在の出願データ：

- (A) 出願番号： 08/364, 081

- (B) 出願日： 1994年12月27日

- (C) 分類：

(vii) 優先権の出願データ：

(A) 出願番号 : 08/019, 780

(B) 出願日 : 1993年2月19日

(viii) 代理人／エージェントの情報 :

(A) 名前 : アラン J. ホーワス

(B) 登録番号 : 36, 553

(C) 参照番号 : T781CIP

(ix) テレコミュニケーションの情報 :

(A) 電話 : (801) 566-6633

(B) テレファクス : (801) 566-0750

(2) 配列番号1の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 13

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎮の数 : 1本鎮

(D) トポロジー : 直鎮状

(ii) 配列の種類 : 合成リンク

(xi) 配列 : 配列番号1

AATTCGCGGC CGC 13

(2) 配列番号2の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 993

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎮の数 : 2本鎮

(D) トポロジー : 直鎮状

(xi) 配列 : 配列番号2

ACT TCA GTT AAT TCT GCA GAA GCC AGC ACT AGT GCT AAC TCT GTA ACT 48  
 Thr Ser Val Asn Ser Ala Glu Ala Ser Thr Ser Ala Asn Ser Val Thr  
 1 5 10 15  
 TGT ACA TTT TCC CAT GGA TAT GAA AAG CCT GAA GAA TTG TGG ATC CCC 96  
 Cys Thr Phe Ser His Gly Tyr Glu Lys Pro Glu Glu Leu Trp Ile Pro  
 20 25 30  
 TTT TCT CCC GCA GCG AGT AGC TGC CAC AAT GCC AGT GGA AAG GTT GCA 144  
 Phe Ser Pro Ala Ala Ser Ser Cys His Asn Ala Ser Gly Lys Glu Ala  
 35 40 45  
 AAG GTT TGC ACC ATC AGT CCC TTG AGC TCC TTG ATT CCT GAA GCA GAA 192  
 Lys Val Cys Thr Ile Ser Pro Leu Ser Ser Leu Ile Pro Glu Ala Glu  
 50 55 60  
 CAT AGC TGG TGG ACG GGG GAT TCT GCT AGT CTC GAC ACG GCA GGC ATC 240  
 Asp Ser Trp Trp Thr Gly Asp Ser Ala Ser Leu Asp Tyr Ala Gly Ile  
 65 70 75 80  
 AAA CTC ACA GTT CCA ATC GAG AAG TTC CCC GTG ACA ACG GAG ACG TTT 288  
 Lys Leu Thr Val Pro Ile Glu Lys Phe Pro Val Thr Thr Gln Thr Phe  
 85 90 95  
 GTC GTC GGT TGC ATC AAG GGA GAG GAC GCA CAG AGT TGT ATG GTC ACG 336  
 Val Val Gly Cys Ile Lys Gly Asp Asp Ala Gln Ser Cys Met Val Thr  
 100 105 110  
 GTG ACA GTA CAA GCC AGA GCC TCA TCG GTC GTC AAT AAT GTC GCA AGG 384  
 Val Thr Val Gln Ala Arg Ala Ser Ser Val Val Asn Asn Val Ala Arg  
 115 120 125  
 TGC TCC TAC GCT GCA GAC AGC ACT CTT GGT CCT GTC AAG TTC TCT GCG 432  
 Cys Ser Tyr Gly Ala Asp Ser Thr Leu Gly Pro Val Lys Leu Ser Ala  
 130 135 140  
 GAA GGA CCC ACT ACA ATG ACC CTC GTC TGC GGG AAA GAT GGA GTC AAA 480  
 Glu Gly Pro Thr Thr Met Thr Leu Val Cys Gly Lys Asp Gly Val Lys  
 145 150 155 160  
 GTT CCT CAA GAC AAC AAT CAG TAC TGT TCC GGG ACG ACG CTG ACT GGT 528  
 Val Pro Gln Asp Asn Asn Gln Tyr Cys Ser Gly Thr Thr Leu Thr Gly  
 165 170 175  
 TGC AAC GAG AAA TCG TTC AAA GAT ATT TTG CCA AAA TTA ACT GAG AAC 576  
 Cys Asn Glu Lys Ser Phe Lys Asp Ile Leu Pro Lys Leu Thr Glu Asn  
 180 185 190  
 CCG TCG CAG GGT AAC GCT TCG AGT GAT AAG GGT GCC ACG CTA ACG ATC 624  
 Pro Trp Gln Gly Asn Ala Ser Ser Asp Lys Gly Ala Thr Leu Thr Ile  
 195 200 205  
 AAG AAG GAA GCA TTT CCA GCC GAG TCA AAA AGC GTC ATT ATT GGA TGC 672  
 Lys Lys Glu Ala Phe Pro Ala Glu Ser Lys Ser Val Ile Ile Gly Cys  
 210 215 220  
 ACA GGG GGA TCG CCT GAG AAG CAT CAC TGT ACC GTG AAA CTG GAG TTT 720  
 Thr Gly Gly Ser Pro Glu Lys His His Cys Thr Val Lys Leu Glu Phe  
 225 230 235 240  
 GCC GGG CCT GCA GGG GGC GCC GGG GGT GGA CGA GGA GGA GCA GCC GGT 768  
 Ala Gly Ala Ala Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala Gly  
 245 250 255  
 GGA GCC GGG GGC GCC GCG GCT GCC GGC GGA GCA GGA GCA GGC GGA GGG 816  
 Gly Ala Gly Gly Ala Ala Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly  
 260 265 270

GCT GGT ACC GAC ACA GAT AAA TAT GTC ACA GGA ATA AAT GCC TCT CAT 864  
 Ala Gly Thr Asp Thr Asp Lys Tyr Val Thr Gly Asn Ala Ile Ser His  
 275 280 285

GGT CAG ACC ACT TAT GGT AAC GCT GAA GAC AAA GAG TAT CAG CAA GAA 912  
 Gly Gln Thr Thr Tyr Gly Asn Ala Glu Asp Lys Glu Tyr Gln Gln Glu  
 290 295 300

TTC GTG GGA ATT ATG ACA GTA ACT ATG ACA TTT AAA TTG GGG CCC CGT 960  
 Phe Val Gly Ile Met Thr Val Thr Met Thr Phe Lys Leu Gly Pro Arg  
 305 310 315 320

AAA GCT ACG GGA CGG TGG AAT CCT CAA CCT GGA 993  
 Lys Ala Thr Gly Arg Trp Asn Pro Gln Pro Gly  
 325 330

(2) 配列番号3の情報：

(i) 配列の特徴：

- (A) 配列の長さ：331
- (B) 配列の型：アミノ酸
- (D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号3

Thr Ser Val Asn Ser Ala Glu Ala Ser Thr Ser Ala Asn Ser Val Thr  
 1 5 10 15

Cys Thr Phe Ser His Gly Tyr Glu Lys Pro Glu Glu Leu Trp Ile Pro  
 20 25 30

Phe Ser Pro Ala Ala Ser Ser Cys His Asn Ala Ser Gly Lys Glu Ala  
 35 40 45

Lys Val Cys Thr Ile Ser Pro Leu Ser Ser Leu Ile Pro Glu Ala Glu  
 50 55 60

Asp Ser Trp Trp Thr Gly Asp Ser Ala Ser Leu Asp Tyr Ala Gly Ile  
 65 70 75 80

Lys Leu Thr Val Pro Ile Glu Lys Phe Pro Val Thr Thr Gln Thr Phe  
 85 90 95

Val Val Gly Cys Ile Lys Gly Asp Asp Ala Gln Ser Cys Met Val Thr  
100 105 110

Val Thr Val Gln Ala Arg Ala Ser Ser Val Val Asn Asn Val Ala Arg  
115 120 125

Cys Ser Tyr Gly Ala Asp Ser Thr Leu Gly Pro Val Lys Leu Ser Ala  
130 135 140

Glu Gly Pro Thr Thr Met Thr Leu Val Cys Gly Lys Asp Gly Val Lys  
145 150 155 160

Val Pro Gln Asp Asn Asn Gln Tyr Cys Ser Gly Thr Thr Leu Thr Gly  
165 170 175

Cys Asn Glu Lys Ser Phe Lys Asp Ile Leu Pro Lys Leu Thr Glu Asn  
180 185 190

Pro Trp Gln Gly Asn Ala Ser Ser Asp Lys Gly Ala Thr Leu Thr Ile  
195 200 205

Lys Lys Glu Ala Phe Pro Ala Glu Ser Lys Ser Val Ile Ile Gly Cys  
210 215 220

Thr Gly Gly Ser Pro Glu Lys His His Cys Thr Val Lys Leu Glu Phe  
225 230 235 240

Ala Gly Ala Ala Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ala Ala Gly  
245 250 255

Gly Ala Gly Gly Ala Ala Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly  
260 265 270

Ala Gly Thr Asp Thr Asp Lys Tyr Val Thr Gly Asn Ala Ile Ser His  
275 280 285

Gly Gln Thr Thr Tyr Gly Asn Ala Glu Asp Lys Glu Tyr Gln Gln Glu  
290 295 300

Phe Val Gly Ile Met Thr Val Thr Met Thr Phe Lys Leu Gly Pro Arg  
305 310 315 320

Lys Ala Thr Gly Arg Trp Asn Pro Gln Pro Gly  
325 330

【図1】

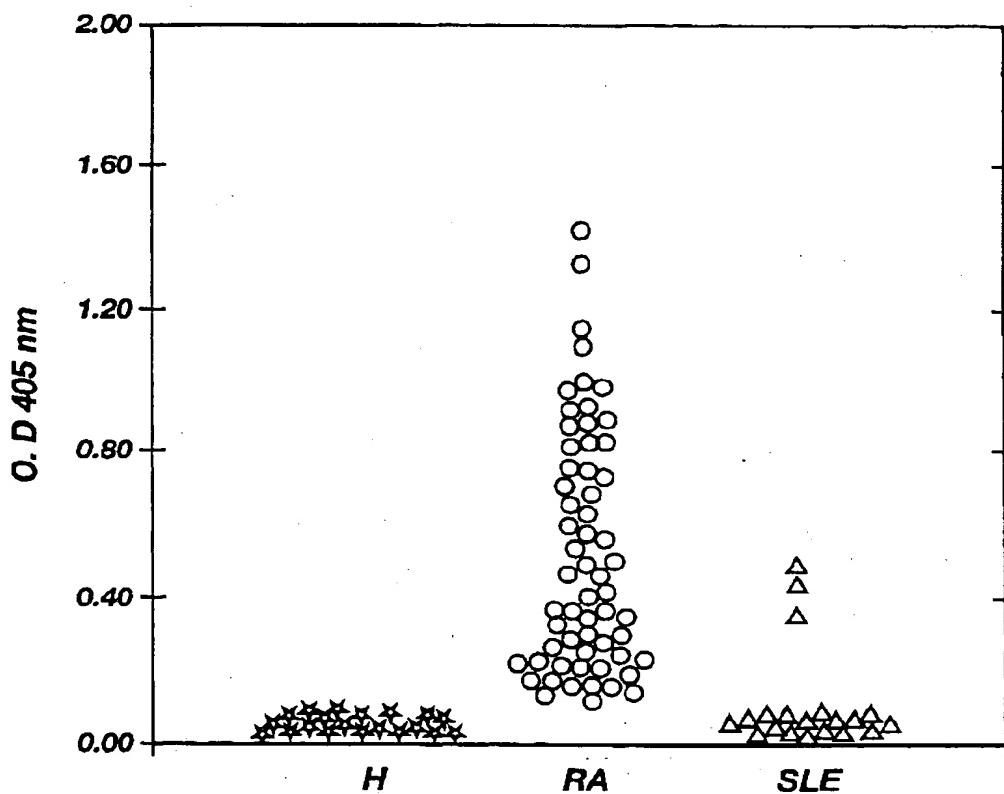
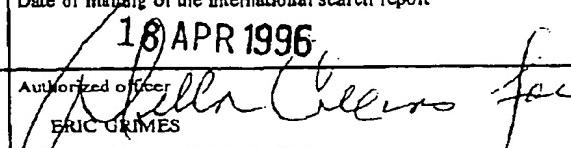


Fig. 1

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US95/16558
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
IPC(6) :C07K 14/435; C12N 1/21, 5/10, 15/12, 15/63; C12P 19/34, 21/02 US CL :435/69.1, 91.51, 240.2, 252.33, 320.1; 530/350; 536/23.5 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/69.1, 91.51, 240.2, 252.33, 320.1; 530/350; 536/23.5		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) APS, Dialog search terms: rheumatoid arthritis, RA, RAMA, antigen??, immunoglobulin, IgM, antibody or antibodies, immunoassay		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	American Journal of Clinical Pathology, Vol. 74, No. 6, issued December 1980, Halbert et al., "A quantitative enzyme immunoassay for IgM rheumatoid factor using human immunoglobulin G as substrate", pages 776-784, see the entire document.	1-28
A	Journal of Immunology, Vol. 141, No. 10, issued 15 November 1988, Burg et al., "Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of Toxoplasma gondii", pages 3584-3591, see the entire document.	1-28
A	Journal of Immunology, Vol. 146, No. 2, issued 15 January 1991, Artandi et al., "Molecular analysis of IgM rheumatoid factor binding to chimeric IgG", pages 603-610, see the entire document.	1-28
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>*'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</li> <li>*'E' earlier document published on or after the international filing date</li> <li>*'L' document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</li> <li>*'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</li> <li>*'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>*'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</li> <li>*'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</li> <li>*'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</li> <li>*'Z' document member of the same patent family</li> </ul>
Date of the actual completion of the international search  04 APRIL 1996	Date of mailing of the international search report  18 APR 1996	
Name and mailing address of the ISA/U.S. Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer  ERIC GRIMES Telephone No. (703) 308-0196	

## フロントページの続き

(51)Int.C] <sup>6</sup>	識別記号	F I
C 1 2 N 5/10	Z NA	C 1 2 P 19/34
15/09		21/02
C 1 2 P 19/34		C
21/02		C 1 2 N 15/00
//(C 1 2 N 1/21		5/00
C 1 2 R 1:19)		Z N A A
(C 1 2 N 15/09	Z NA	B
C 1 2 R 1:91)		

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE,  
DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M  
C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG  
, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN,  
TD, TG), AP(KE, LS, MW, SD, SZ, U  
G), AL, AM, AT, AU, BB, BG, BR, B  
Y, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES  
, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG,  
KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, L  
V, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ  
, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,  
SK, TJ, TM, TT, UA, UG, UZ, VN